

PAT-NO: JP401231898A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 01231898 A
TITLE: MEASUREMENT OF NUCLEIC ACID SEQUENCE AND SOLID CARRIER USED FOR SAID MEASUREMENT
PUBN-DATE: September 18, 1989

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
NAITO, TSUTOMU	
AKIMOTO, ICHIRO	
HAYAKAWA, TADAYUKI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
EIKEN KAGAKU KK	N/A

APPL-NO: JP63056279
APPL-DATE: March 11, 1988

INT-CL (IPC): C12Q001/68 , G01N033/50

US-CL-CURRENT: 435/6

ABSTRACT:

PURPOSE: To readily and accurately perform the separation of hybridized nucleic acid from non-hybridized nucleic acid by employing a bead-like carrier coated with a strongly basic polyamino acid as a solid carrier for immobilizing the nucleic acid in a specimen.

CONSTITUTION: In a nucleic acid sequence-measuring method including steps of immobilizing the nucleic acid or a modified product thereof in a specimen on a solid carrier, bringing the immobilized nucleic acid or the modified product into contact with a signal probe having a complementary base sequence against the nucleic acid to be detected to hybridize them and measuring the amount of the signal substance in the liquid or solid phase, a bead-like carrier coated with a strongly basic polyamino acid is employed as the carrier. Poly L-lysine, poly L-arginine, poly L-histidine, etc., is preferably used as the strongly basic polyamino acid.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A) 平1-231898

⑤ Int. Cl.⁴C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号

A-6807-4B
P-7055-2G

⑬ 公開 平成1年(1989)9月18日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 核酸配列測定法およびそれに用いる固相担体

⑰ 特 願 昭63-56279

⑱ 出 願 昭63(1988)3月11日

⑲ 発 明 者 内 藤 勉 栃木県那須郡西那須野町太夫塚1-195

⑲ 発 明 者 秋 本 一 郎 栃木県那須郡西那須野町二区町34

⑲ 発 明 者 早 川 忠 之 栃木県那須郡西那須野町南町6-6 コーボナガイB-202

⑳ 出 願 人 栄研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号

明 細 書

1. 発明の名称

核酸配列測定法およびそれに用いる固相担体

2. 特許請求の範囲

1) a. 試料中の核酸あるいはその変性物を固相担体に固定し、

b. 得られた核酸あるいはその変性物を固定化した固相担体と、検出すべき核酸に対して相補的塩基配列を有する標識プローブとを接触させてハイブリダイズさせた後、

c. 液相または固相の標識量を測定する

工程を含んでなる核酸配列測定法であって、固相担体として強塩基性ポリアミノ酸で被覆したビーズ状担体を用いることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法

2) 強塩基性ポリアミノ酸で被覆されたビーズ状担体からなることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションアッセイ用固相担体

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、微生物学、遺伝子工学、免疫学、法医学等の分野における細菌やウイルス等の同定あるいは検出、哺乳動物の染色体分析等に有用な核酸の試験に関するものである。

更に詳しくは、互いに相補的なヌクレオチド鎖の特異的な親和性を利用した特定のヌクレオチド配列検出のための核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法に関するものである。

〔従来技術〕

臨床検査領域等を中心として、病原性の微生物やウイルス、あるいは発癌遺伝子に代表される異常遺伝子等の核酸ハイブリダイゼーションアッセイ(以下DNA-HAと略す)による分析が実用化されている。

DNA-HAは互いに相補的なヌクレオチド配列の親和性を利用した分析法で、基本的には次のような操作に基づいて実行される。

① 被検材料中の核酸に場合によりアルカリ処理、加熱処理、酵素処理等を加えて試料を調整する工程

②試料と、検出しようとするヌクレオチド配列に対し相補的な配列を有する標識プローブと接触させる工程

③ハイブリダイゼーションを起こし（または起こさず）2本鎖となった（またはならなかった）標識プローブの有無、あるいはその量を標識量を測定することによって決定する工程。

ところで不均一系DNA-HAの場合、標識量の測定にあたって、ハイブリダイゼーションを起こしたものと起こさなかったものを物理的に分離する操作が必要になる。この分離操作には、上記①～③の各工程の間に試料中の核酸を種々の結合反応を利用して固相担体に結合させる方法と、クロマトグラフィー等を利用した方法がある。

前者の固相担体を利用する方法としては、ニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンを用いこれに試料中の核酸を固定した後上記④以下の工程を行なう分析系が汎用されているが、この他にも特開昭61-219400号公報に開示されているようなマイクロプレートのウェルを固相

NAの特異的吸着を利用して行なっている（公表特許昭60-501339号公報）。この方法においては、液相系でハイブリダイズさせるので反応に要する時間は1時間程度と大きく短縮されているものの、反面ハイドロキシルアパタイトを使用することにより固相担体には無い問題点を生じる。すなわち、ハイドロキシルアパタイト粒子懸濁液を均一に分注するために細心の注意を払わなければならない点、あるいはハイドロキシルアパタイトへの非特異的な標識プローブの吸着を除くための遠心分離や洗浄等複雑な操作が必要な点等がそれである。

したがって、固相担体を利用する方法の簡便な操作と、液相系での反応で得られる迅速性とを兼ね備えたDNA-HAの実現が望まれている。

【発明の目的】

本発明は、固相担体を用いた場合の簡便な分離操作と、液相系の反応で得られる迅速性とを有するDNA-HAを可能とすることを目的としている。

担体として用いる試みもなされている。

ニトロセルロースフィルター等固相担体への核酸やその変性物の固定には、通常物理的な吸着が利用されており、長時間の加熱乾燥工程等の複雑な操作を伴う。特開昭61-219400号公報には標識方法の改良で感度を上昇させてマイクロプレートのウェルを固相担体として利用することにより検体中DNAの固定操作を簡略化した例が記載されている。しかしこの方法においても、試料中に核酸類以外の細胞成分等不純物が多量に含まれる場合には、溶媒による抽出操作が必要となることが多く必ずしも簡便な方法であるとは言えない。

他方後者のクロマトグラフィーを利用する方法としては、ハイドロキシルアパタイトの使用が知られている。近年、細菌類のリボゾームRNAをターゲットとして液相系でのDNA-HAの臨床診断への応用が検討されはじめているが、このような方法の多くは前記分離操作をハイドロキシルアパタイトを用いた至適リン酸濃度での2本鎖D

すなわち本発明は、核酸やその変性物がその他の成分と共存する場合であっても溶媒抽出操作や加熱処理等従来の核酸の固定に必要とされていた複雑な操作を省略することができ、しかも迅速なハイブリダイゼーションを行ない得るという液相系の特徴を損なうことのないDNA-HAを提供するものである。

【発明の構成】

本発明は、

- a. 試料中の核酸あるいはその変性物を固相担体に固定し、
- b. 得られた核酸あるいはその変性物を固定化した固相担体と、検出すべき核酸に対して相補的な塩基配列を有する標識プローブとを接触させてハイブリダイズさせた後、
- c. 液相または固相の標識量を測定する工程を含んでなる核酸配列測定法であって、固相担体として強塩基性ポリアミノ酸で被覆したビーズ状担体を用いることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションアッセイ法、および

強塩基性ポリアミノ酸で被覆されたビーズ状担体からなることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションアッセイ用固相担体である。

本発明における強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体は、例えばビーズを強塩基性ポリアミノ酸の水溶液中に浸漬して強塩基性ポリアミノ酸を物理的に吸着させた後、これを洗浄することによって得ることができる。〔ジェイ・ロイフ等 (J. Rauch, et al.) ジャーナル・オブ・リウマトロジー (Journal of Rheumatology) 12:3,482(1985)〕

この他、ビーズ上にカルボキシル基等の適当な官能基を導入し、強塩基性ポリアミノ酸のアミノ基と反応させて化学的に両者を結合させることも可能である。

本発明で利用される強塩基性ポリアミノ酸としては、ポリーL-リジン (以下PLLと略す)、ポリーL-アルギニン (以下PLAと略す)、ポリーL-ヒスチジン等が挙げられる。これら強塩基性ポリアミノ酸は、市販されているものを用い

れば良い。

一方本発明におけるビーズ状担体の材質は、ポリスチレン、ガラス、ナイロン等強塩基性ポリアミノ酸で被覆できるものであれば特に限定されるものではないが、中でもポリスチレンやガラスは強塩基性ポリアミノ酸の吸着性に優れており好ましい材質として挙げることができる。

またビーズ状担体は、強塩基性ポリアミノ酸吸着面積を大きくするために表面を粗面化することもできる。あるいは必要に応じてビーズ状担体を着色したり表面に文字や記号を付すことによってビーズの識別性を高めることもできる。

固相担体の形状はビーズ状であればよく、したがって文字どおり球形のものをはじめとして、多面体状のものや表面に凹凸を設けたもの等を用いることもできる。免疫分析等の分野では固相担体としてマイクロプレートのウェル等も利用されるが、本発明ではビーズ状のものを利用することによって迅速なハイブリダイズを可能としているのである。

以下具体的に説明する。

細胞や核構造の破壊によって遊離した核酸あるいはその変性物は、それらを含有する試料溶液と強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体とを接触させることによって固定される。このとき核酸やその変性物以外の種々の物質が試料溶液中に共存するものと考えられるが、本発明においては特にこれらの物質を予め分離しておく必要はない。こうして得られた核酸あるいはその変性物を固定した強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体は、必要ならば適当な緩衝液等で予め洗浄した後に工程bに供される。

試料溶液中の核酸やその変性物の純度が高くかつ少量しか存在しない場合強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体の表面に核酸固定活性が残存することも考えられるが、そのようなときには必要に応じて標識プローブと接触させる前にサケ精子DNA等を用いる公知のブロック法を応用してブロッキングを行なうとバックグラウンド信号を低減させることができる。

本発明によるDNA-HAに用いる標識プローブとしては、従来のDNA-HAに利用されていたものと同様のものが使用できる。すなわち、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、酵素等で直接的に標識されたもの、あるいはアビジン-ビオチンシステムや抗原-抗体反応等を利用して間接的に標識を付したものの等が利用できる。

本発明のDNA-HAにおいて、強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体に固定される試料由来の核酸の変性物としては、具体的には例えばつぎのようなものが挙げられる。

○試料に由来する2本鎖DNAをアルカリ処理、加熱等の操作により1本鎖DNAとしたもの

○試料に由来するDNAをin vitro DNA増幅〔サエキ等 (Saeki et al.) サイエンス (SCIENCE) 230,1350(1985)〕により増幅したもの

○ランダムプライマーと逆転写酵素等を用い、試料中のRNAからcDNAを導き、このcDNAについてin vitro DNA増幅を行なったもの

つづいて本発明のDNA-HA中の工程aにつ

一方本発明によるDNA-HA用固相担体は、必要に応じて標識プローブやその測定に有用な蛍光試薬や発光試薬等と組み合わせてキットとすることができる。

【発明の作用】

本発明における強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ状担体は、抽出操作や担体の加熱操作を行なうことなく試料溶液と接触させるだけで核酸やその変性物を迅速にかつ簡便に固定化する作用を有するものである。

先に引用したジェイ・ロイフ等は抗体検出用抗原としての純粋なDNAの固定にPLLを利用しているが、本発明者等はPLLをはじめとする強塩基性ポリアミノ酸がDNA-HAにおいて共存する物質の中から核酸やその変性物を効率的に分離するために用い得ることを発見し本発明に至ったものである。

以下実施例に基づき本発明を更に詳細に説明する。

【実施例】

なお細胞溶解液としては、プロテイナーゼK（ベリンガー・マンハイム社製）を4mg/ml含有する2%ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略す）溶液を用いた。

細胞は、ヒト由来細胞としてヒト肝ガン細胞（KA）を、対照としてマウス骨髄腫細胞（P3U1）を、各々試験管1本当たり100～20万個となるように調整して用いた。

○DNA-HA

前記PLL被覆ビーズを前記試料溶液中に投漬し、65℃で1時間核酸変性物を固定させた後0.025Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.4）300μlで洗浄した。このPLL被覆ビーズの入った試験管へ、標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液200μlを分注した。

ハイブリダイゼーション溶液は、

1M食塩

10×PM

10mMEDTA

0.1%SDS

実施例1. 強塩基性ポリアミノ酸としてPLLを用いたヒト由来細胞中のDNAの検出
○PLL被覆ビーズの調製

0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.3）に10μg/ml濃度でPLL塩酸塩（No.P-1399、シグマ社製）を溶かし、この中にポリスチレンビーズ（1/6インチ、清水化学工業製）を投漬して室温で1時間感作させた。これを0.025Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.4）で洗浄してPLL被覆ビーズを得た。

○標識プローブ

Alu family fragment(300bp、オンコア社製)をプローブとし、¹²⁵I標識dCTP（アマーシャム社製）を使ってニクトランスレーション法により標識し¹²⁵I標識プローブとした。

○試料溶液の調製

細胞浮遊液300μlに細胞溶解液100μlを加え、37℃で30分間反応させた。反応後2規定の水酸化ナトリウム水溶液20μlを加えて5分間アルカリ処理し、次いで2規定の塩酸20μlを加え中和して試料溶液とした。

を含む0.05Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）、ただし1×PMの組成は0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%フィコール、および0.02%ウシ血清アルブミンである。また標識プローブは試験管1本当たり 2×10^5 cpm（S.A.: 4×10^7 cpm/μg-DNA）となるように添加した。

65℃で1時間ハイブリダイズさせた後ハイブリダイゼーション溶液を除去し、洗浄液300μlでPLL被覆ビーズを洗浄し、γカウンタによりビーズ上の標識プローブに由来する放射線量を計数した。結果は、第1図に示すとおりである。なお洗浄液は0.1%SDS含有0.1×SSC（1×SSCの組成は0.15M食塩、0.015Mクエン酸ナトリウムである）を用いた。

ヒト由来の細胞は、プローブとして用いたAlu family fragment(300bp)と特異的にハイブリダイズする反復配列を含むDNAを有しているため、細胞数の増加とともにPLL被覆ビーズ上でのハイブリダイズの割合が高まっていることが観察された。一方対照として用いたマウス骨髄腫細胞で

は、細胞数を増やしても標識プローブとのハイブリダイズは起こらないことが確認された。更に、マウス骨髄腫細胞を用いた場合のカウント数は、細胞数とは関係なく500cpm以下であり、標識プローブの非特異吸着は0.25%以下と低いものであった。

実施例2. 強塩基性ポリアミノ酸としてPLLを用いた結核菌の検出

○PLL被覆ビーズの調製

PLL被覆ビーズは、実施例1.と同じものを用いた。

○標識プローブ

プローブDNAとして25merオリゴヌクレオチド合成プローブ(1本鎖)を塩化ナトリウムを用いてNa¹²⁵Iで標識し、標識プローブとした。なお合成プローブは、アプライドバイオシステム社のDNA合成機を使ってβ-シアノエチルアミダイド法により合成したものをを用いた。

○試料溶液の調製

寒天培地(1%小川培地、榮研化学調製)表面

6×SSC

10mMEDTA

5×PM

0.5%SDS

である。また標識プローブは試験管1本当たり 3×10^5 cpm(S.A.: 5×10^7 cpm/ μ g-DNA)となるように加えた。

65℃で1時間ハイブリダイズさせた後ハイブリダイゼーション溶液を除去し、更に0.1%SDS含有0.1×SSC溶液300 μ lで洗浄し、γ-カウンターでPLL被覆ビーズ上の標識プローブに由来する放射線量を計数した。結果は第2図に示すとおり、TB特異性を持つプローブを用いているため対照のマイクロバクテリウム・アビウムとはハイブリダイズしていないことがわかる。

実施例3. 強塩基性ポリアミノ酸としてPLAを用いたヘルペスシンプレックスウイルスの定量

○PLA被覆ビーズの調製

PLLにかえてPLA硫酸塩(No.p-4017、シグ

マ社の被検菌のコロニーをかきとって滅菌水に浮遊させ、ナンバー1マクファーランドスタンダードで菌数が試験管1本当たり $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ となるように調整した。得られた各菌体浮遊液100 μ lに溶解試薬100 μ lを加え、室温で1時間放置して菌体内のRNAを溶出させ試料溶液とした。

なお溶解試薬としては、実施例1と同じものを用いた。

被検菌は、結核菌としてマイコバクテリウム・ツベルクロシス(*Mycobacterium tuberculosis*)を、対照としてマイコバクテリウム・アビウム(*M. avium*)を用いた。

○DNA-HA

PLL被覆ビーズを前記試料溶液中に浸漬し、65℃で1時間放置してRNAを固定後0.025Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)300 μ lで洗浄した。このPLL被覆ビーズの入った試験管へ、標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液200 μ lを分注した。

ハイブリダイゼーション溶液の組成は、

マ社製)を用いる他は、実施例1と同様の操作によりPLA被覆ビーズを得た。

○標識プローブ

Alu family fragment DNAにかえてヘルペスウイルスI型(以下HSV-Iと略す)DNAのビーグルII(以下BglIIと略す)断片(5.3kb)を利用する他は、実施例1と同様の操作により標識プローブを得た。

HSV-I BglII断片は、次のような操作にしたがって調製した。まず感染細胞より抽出精製したHSV-I(WT-51)のDNAおよびプラスミドベクターpNEO(ファルマシア社製)を各々BglIIで切断後、ライゲーションキット(寶酒造調製)を用いてリコンビナントプラスミドを作成した。次いで該プラスミドを大腸菌JW103に導入し、形質転換したものの中から他のウイルスDNAと交差性を示さないクローンを選び、大量培養後DNAを回収・精製してHSV-I BglII断片を得た。

○試料溶液の調製

10pg~25mgのDNAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.3, 1mMEDTA含有)200 μ lに2規定の水酸化ナトリウム水溶液20 μ lを加えて5分間アルカリ処理し、次いで2規定の塩酸20 μ lを加え中和して試料溶液とした。

DNAは感染細胞から抽出・精製したHSV-IのDNA、並びに対照としての λ ファージHind III断片(ニッポンジーン調製)を用いた。

○DNA-HA

標識プローブを試験管1本当たり 3.6×10^5 cpm (S.A.: 8×10^7 cpm/ μ g-DNA) となるように添加する他は、実施例1と同様の操作にしたがってDNA-HAを行なった。結果は第3図に示すとおりである。

HSV-IのDNA量の増加にともなう、ハイブリダイズの割合が定量的に高まっていることがわかる。

【発明の効果】

本発明は、強塩基性ポリアミノ酸を被覆したビーズ状担体を利用することによって、液相系の迅

速な反応と固相担体を用いた場合の簡便性とを兼ね備えたビーズ法をDNA-HAに導入したものである。ビーズ法は免疫測定分野では簡便な方法としてよく知られ汎用されているが、DNA-HAの分野においては核酸やその変性物を固相上に捕獲・固定する過程が免疫測定法における抗原抗体反応ほど特異的でなく、したがって吸着能や選択性の点から実現が困難であった。本発明では核酸やその変性物の吸着能を向上させることによってDNA-HAにおけるビーズ法を実現したのである。

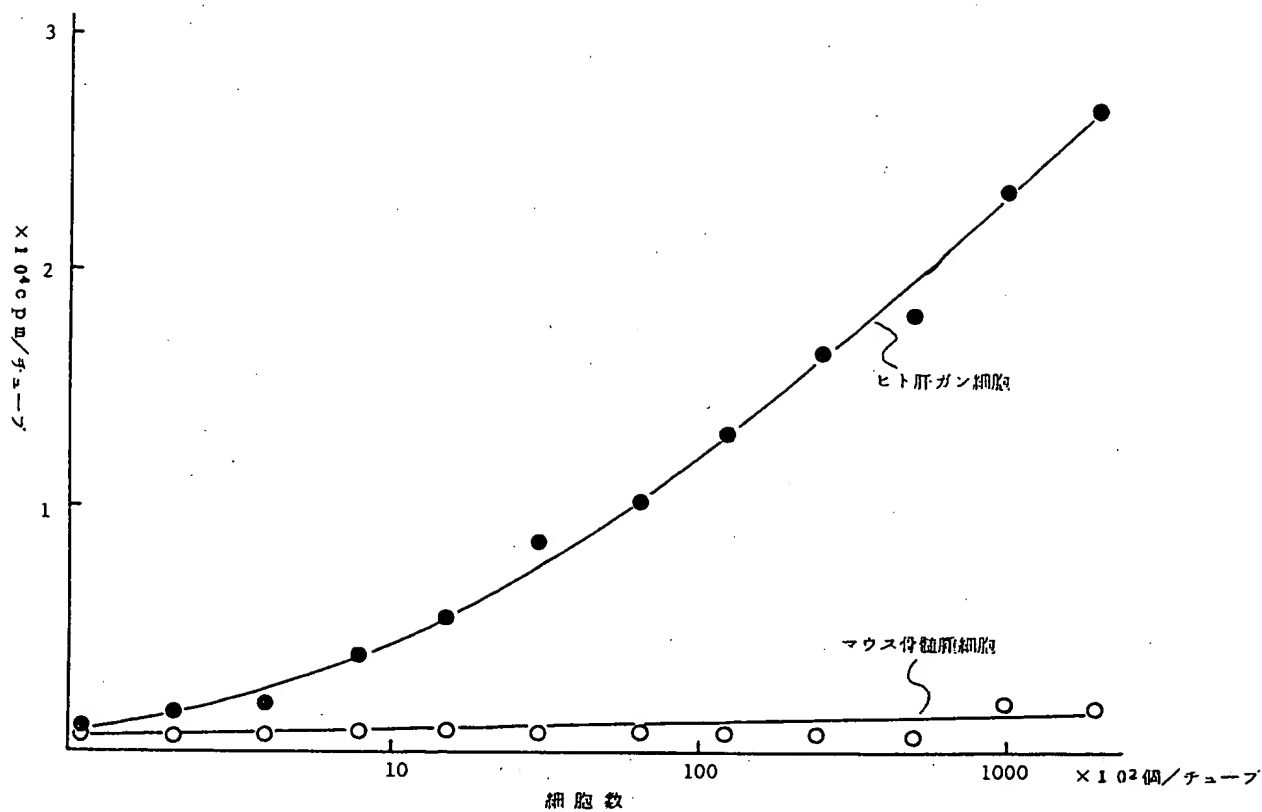
更に本発明によるDNA-HAは、試料中に不純物が多く含まれる場合でも、攪拌、振とう、そして溶媒層の分離という機械化が困難な操作を伴なう抽出操作を省くことが可能となるうえ、ビーズ状担体を反応容器の中へ投入することができる。そのため、従来の免疫反応装置と同様の機構を利用して、容易にDNA-HAの自動化を図ることができるものと考えられる。

4. 図面の簡単な説明

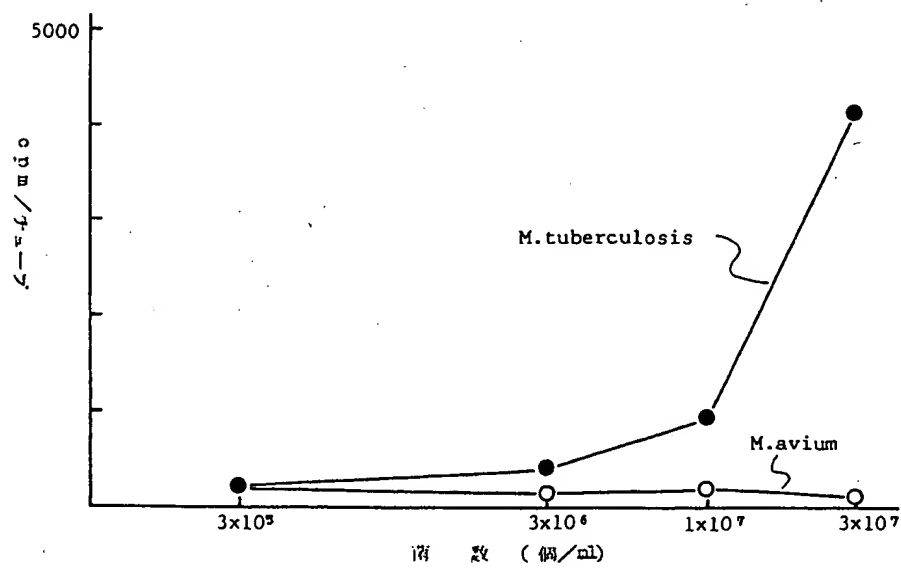
第1図は実施例1.の結果を、第2図は実施例2.の結果を、第3図は実施例3.の結果を示すグラフである。図中、縦軸は試験管1本当たりの強塩基性ポリアミノ酸被覆ビーズ上の標識プローブに由来する放射線量の計数値を、横軸は試験管1本当たりの細胞数またはウィルスの精製DNAの量を示す。

特 許 出 願 人
栄研化学株式会社

第 1 図



第 2 図



第 3 図

